ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

ANNEE 1971 N° 50

UTILISATION DE LA METHODE DE COMPTAGE ELECTRONIQUE DES PARTICULES POUR L'ANALYSE BACTERIOLOGIQUE DU LAIT

THÈSE

POUR LE DOCTORAT VÉTÉRINAIRE
(Diplôme d'Etat)

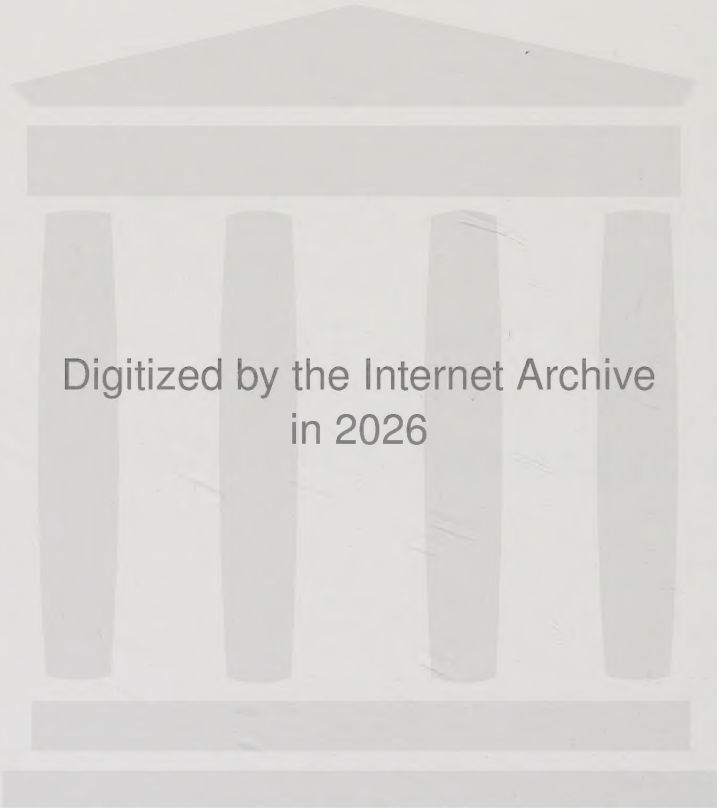
Présentée et soutenue publiquement en juin 1971
devant
l'Université Paul-Sabatier de Toulouse
par

SAMA Koffi Emmanuel
né en 1944 à Amoutchou (Atakpamé) TOGO

JURY
Présidente : Mme ENJALBERT
Professeur à l'Université Paul-Sabatier de Toulouse
Assesseurs : MM LABIE, SAURAT — *Professeurs à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse*

S. E. I. L.
TOULOUSE
1971

UTILISATION DE LA METHODE DE COMPTAGE ELECTRONIQUE DES PARTICULES POUR L'ANALYSE BACTERIOLOGIQUE DU LAIT


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536520_0042

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

ANNEE 1971 N° 50

UTILISATION DE LA METHODE DE COMPTAGE ELECTRONIQUE DES PARTICULES POUR L'ANALYSE BACTERIOLOGIQUE DU LAIT

THÈSE

POUR LE DOCTORAT VÉTÉRINAIRE
(Diplôme d'Etat)

Présentée et soutenue publiquement en juin 1971
devant
l'Université Paul-Sabatier de Toulouse
par

SAMA Koffi Emmanuel
né en 1944 à Amoutchou (Atakpamé) TOGO

JURY

Présidente : Mme ENJALBERT
Professeur à l'Université Paul-Sabatier de Toulouse

Assesseurs : MM. LABIE, SAURAT — *Professeurs à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse*

S. E. I. L.
TOULOUSE
1971

MINISTERE DE L'AGRICULTURE

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur ..... M. FLORIO
Directeurs Honoraires .. MM. PONS
DARRASPEN

Professeur Honoraire : M. LOMBARD

PERSONNEL ENSEIGNANT

Chaire de Pharmacie et Toxicologie :
Professeur titulaire ..... M. GODFRAIN
Maître-Assistant ..... Mme BURGAT-SACAZE
Pharmacie et Toxicologie

Chaire de Physique et Chimie Biologiques et Médicales :
Professeur titulaire ..... M. RICO
Maître-Assistant Agrégé .. M. LORGUE
Physique biologique et médicale
Chimie biologique et médicale

Chaire d'Anatomie des Animaux Domestiques :
Professeur titulaire ..... M. PAVAUX
Anatomie descriptive - Extérieur
Anatomie appliquée - Tératologie

Chaire de Physiologie et Thérapeutique :
Professeur titulaire ..... M. RUCKEBUSCH
Maître-Assistant Agrégé .. M. FARGEAS
Physiologie - Thérapeutique et Pharmacodynamie

Chaire d'Histologie - Anatomie Pathologique :
Professeur titulaire ..... M. VAN HAVERBEKE
Maître de Conférences, non chef de Service, Prof. sans Chaire ..... M. CABANIE
Histologie - Embryologie - Anatomie Pathologique

Chaire d'Hygiène et Industrie des Aliments d'origine animale :
Professeur titulaire ..... M. LABIE
Maître-Assistant ..... M. EECKHOUTTE
Hygiène, Inspection, Contrôle et Technologie des denrées alimentaires d'origine animale

Chaire de Parasitologie et Maladies Parasitaires :
Professeur titulaire ..... M. BRIZARD
Maître-Assistant ..... M. DORCHIES
Zoologie appliquée - Parasitologie externe
Parasitologie interne - Clinique

Chaire de Sémiologie et Pathologie Médicale des Equidés et Carnivores :
Professeur titulaire ..... M. FLORIO
Maître de Conférences, non Chef de Service, Prof. sans Chaire ..... M. LESCURE
Maître-Assistant ..... M. GUELFI
Sémiologie et Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores - Législation Vétérinaire et Déontologie Clinique

Chaire de Pathologie Médicale du Bétail et des animaux de basse-cour :
Professeur titulaire ..... M. TOURNUT
Maître de Conférences, non chef de Service, Prof. sans Chaire ..... M. ESPINASSE
Sémiologie et Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour - Clinique
Clinique ambulatoire

Chaire de Pathologie Chirurgicale :
Professeur titulaire ..... N.
Maître de Conférences, Chef de Service ..... M. CAZIEUX
Propédeutique et Sémiologie chirurgicale
Technique chirurgicale - Pathologie chirurgicale
Podologie - Clinique

Chaire de Pathologie de la Reproduction :
Professeur titulaire ..... M. BERTHELON
Maître de Conférences, non Chef de Service, Prof. sans chaire ..... M. ROYAL
Sémiologie et propédeutique
Pathologie de la Reproduction
Obstétrique - Clinique

Chaire de Maladies Contagieuses - Zoonoses - Législation Sanitaire :
Professeur titulaire ..... M. SAURAT
Maître-Assistant ..... M. CHANTAL
Maladies Contagieuses - Zoonoses
Législation Sanitaire

Chaire de Pathologie Générale - Microbiologie - Immunologie :
Professeur titulaire ..... M. LAUTIE
Microbiologie - Immunologie
Pathologie Générale

Chaire de Zootechnie et Economie Rurale :
Professeur titulaire ..... M. QUEINNEC
Maître-Assistant ..... M. DARRE
Ethnologie - Génétique appliquée - Hygiène Générale
Zootechnie - Elevage - Economie Générale et des productions animales

Chaire d'Alimentation :
Professeur titulaire ..... M. FALIU
Maître-Assistant Agrégé .. M. GRIESS
Botanique appliquée et Bromatologie
Agronomie - Alimentation

COURS COMPLEMENTAIRES CHARGES D'ENSEIGNEMENT

Antibiothérapie des Maladies infectieuses ..... M. MONNIER
Aspect médical des Zoonoses ..... M. ARMENGAUD
Energétique ..... M. LABOUCHE
Initiation à l'informatique biomédicale ..... M. FERNET
Agronomie ..... M. COMBRET
Métabolismes ..... M. RAYNAUD

La Faculté et l'Ecole déclarent n'être pas responsables des opinions émises par les candidats (Délibération de la Faculté, en date du 10 mai 1891 et du Conseil de l'Ecole, en date du 13 juin 1924).

UNIV. LEIDEN BIBL.

A MA FAMILLE

A MES PARENTS

A MES AMIS

A MON PAYS, LE TOGO

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE :

MADAME LE PROFESSEUR ENJALBERT

de l'Université Paul-Sabatier de Toulouse

Qui nous a fait le grand honneur d'accepter la Présidence de notre Jury de Thèse.
Hommages respectueux.

A NOTRE JURY DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR LABIE,

de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Qui nous a inspiré notre sujet de thèse et assure avec bienveillance notre formation post-scolaire. Notre présence dans son Service témoigne de l'intérêt que son enseignement et ses hautes qualités humaines ont suscité en nous.
Qu'il veuille trouver ici l'humble expression de notre profonde admiration et de notre reconnaissance.

MONSIEUR LE PROFESSEUR SAURAT,

de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
Chevalier de la Légion d'Honneur

Qui a bien voulu faire partie de notre Jury de Thèse. Nous garderons de lui l'image d'un grand Maître.
Hommages respectueux et reconnaissants.

A TOUS NOS MAITRES
DE L'ECOLE NATIONALE VETERINAIRE
DE TOULOUSE

A TOUT LE PERSONNEL DE LA CHAIRE D'HIDAOA

de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

A MADEMOISELLE M. DELZONS,

du Laboratoire d'HIDAOA (E.N.V. de Toulouse)

Dont la sollicitude à notre égard ne s'est jamais démentie.
Sincères remerciements.

A MONSIEUR LE DOCTEUR VETERINAIRE SAPY
ET MADAME,

31 - BAGIRY

Pour l'accueil chaleureux qu'ils nous ont toujours réservé dans leur foyer.

A LA FAMILLE BRAUN,

78 - CHANTELOUP-LES-VIGNES

Témoignage de notre amitié.

INTRODUCTION

Le lait, aliment diététique par excellence, constitue malheureusement un bon milieu de culture pour différentes espèces bactériennes ; sa composition chimique, son pH voisin de la neutralité, se prêtent favorablement à la prolifération des germes. Déjà pollué avant sa sortie de la mamelle par une flore endogène variée, le lait se trouve exposé, de la récolte à l'ingestion par le consommateur, à des contaminations par une flore exogène d'origine diverse (vache, fourrage, litière, fèces, etc.) et comprenant des espèces banales mais quelquefois également des souches pathogènes. Cette flore microbienne, d'abord inhibée pendant quelques heures par les substances bactériostatiques du lait, les lacténines ou agglutinines, se multiplie ensuite rapidement, surtout quand le lait n'est pas conservé à basse température.

Les conséquences hygiéniques, technologiques, diététiques et économiques de la pollution du lait justifient les contrôles dont cette denrée fait l'objet et la multitude de procédés d'examens mis en œuvre. Les entreprises qui paient le lait suivant sa qualité bactériologique sont, chaque année, plus nombreuses, mais les méthodes d'analyse qu'elles utilisent diffèrent souvent de façon notable ; or, suivant la qualité, les écarts de prix dépassent fréquemment 10 % du prix indicatif. Si la recherche des germes pathogènes pour l'homme exige des techniques délicates, un personnel qualifié et un matériel onéreux, et demeure, de ce fait, l'apanage de laboratoires spécialisés, il apparaît nécessaire, pour l'appréciation de la flore microbienne globale et des qualités de conservation du lait cru, de même que pour le contrôle de l'efficacité des traitements thermiques, de donner aux professionnels une méthode unique, simple et rapide, permettant le contrôle journalier d'un grand nombre d'échantillons et des comparaisons équitables entre les laits de différents producteurs.

Grâce à l'électronique, il semble possible de mettre au point un procédé répondant à ces impératifs. Le Professeur TOLLE et ses collaborateurs, de l'Institut d'Hygiène du Lait de Kiel, en Allemagne Fédérale, ont déjà utilisé un protocole d'examen bactériologique du lait à l'aide d'un compteur automatique de particules. C'est en nous inspirant de leurs travaux que nous avons expérimenté cette nouvelle méthode et nous commenterons, dans ce travail, les résultats des analyses que nous avons effectuées après avoir décrit le protocole expérimental.

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

I. — PRINCIPE DE LA METHODE

II. — MATERIEL

III. — TECHNIQUE OPERATOIRE

1° - Préparation des échantillons

2° - Comptage

I. - PRINCIPE DE LA METHODE

La méthode de comptage électronique des microcolonies bactériennes est une application à la bactériologie du principe mis au point par COULTER, en 1956, principe dont dérivent les compteurs Coulter.

Les bactéries d'un échantillon de lait sont placées dans un milieu nutritif solide adéquat, incubées dans des conditions déterminées, de manière qu'elles se développent dans l'épaisseur du milieu sous forme de microcolonies sphériques. Après fixation de ces microcolonies, liquéfaction du milieu et mise en suspension dans un électrolyte, elles se comportent comme des particules solides qui peuvent être dénombrées à l'aide d'un compteur électronique de particules.

Le comptage s'effectue en faisant circuler la suspension à travers une ouverture capillaire calibrée, munie de chaque côté d'une électrode immergée, une d.d.p. étant appliquée entre les deux électrodes. Chaque fois qu'une particule s'engage dans l'ouverture, elle déplace un volume d'électrolyte correspondant à son propre volume et modifie par conséquent la résistance entre les électrodes ; il en résulte une impulsion de tension de courte durée dont l'amplitude est proportionnelle au volume de la particule. La série d'impulsions ainsi produite est amplifiée et comptée électroniquement.

Un dispositif d'aspiration, constitué par une source de vide primaire, permet le passage forcé de la suspension à travers l'ouverture capillaire. Le même dispositif déséquilibre un manomètre à mercure lorsque le robinet de contrôle du vide est ouvert ; la fermeture du robinet isole le système de vide extérieur et l'action de siphon de la colonne de mercure entretient la circulation

de la suspension à étudier. La colonne de mercure en avançant établit des contacts de démarrage et d'arrêt du compteur, grâce à des électrodes placées à des intervalles précis et connus, ce qui permet de choisir un volume constant de suspension pour tous les comptages.

Les impulsions de tension, nées du passage des particules entre les électrodes de l'orifice capillaire, sont amplifiées et envoyées sur un circuit à seuil réglable. Si le niveau de seuil choisi est atteint ou dépassé par une impulsion, celle-ci est comptée. Le niveau de seuil est indiqué sur un écran d'oscilloscope par une luminosité plus grande des segments au-dessus du seuil.

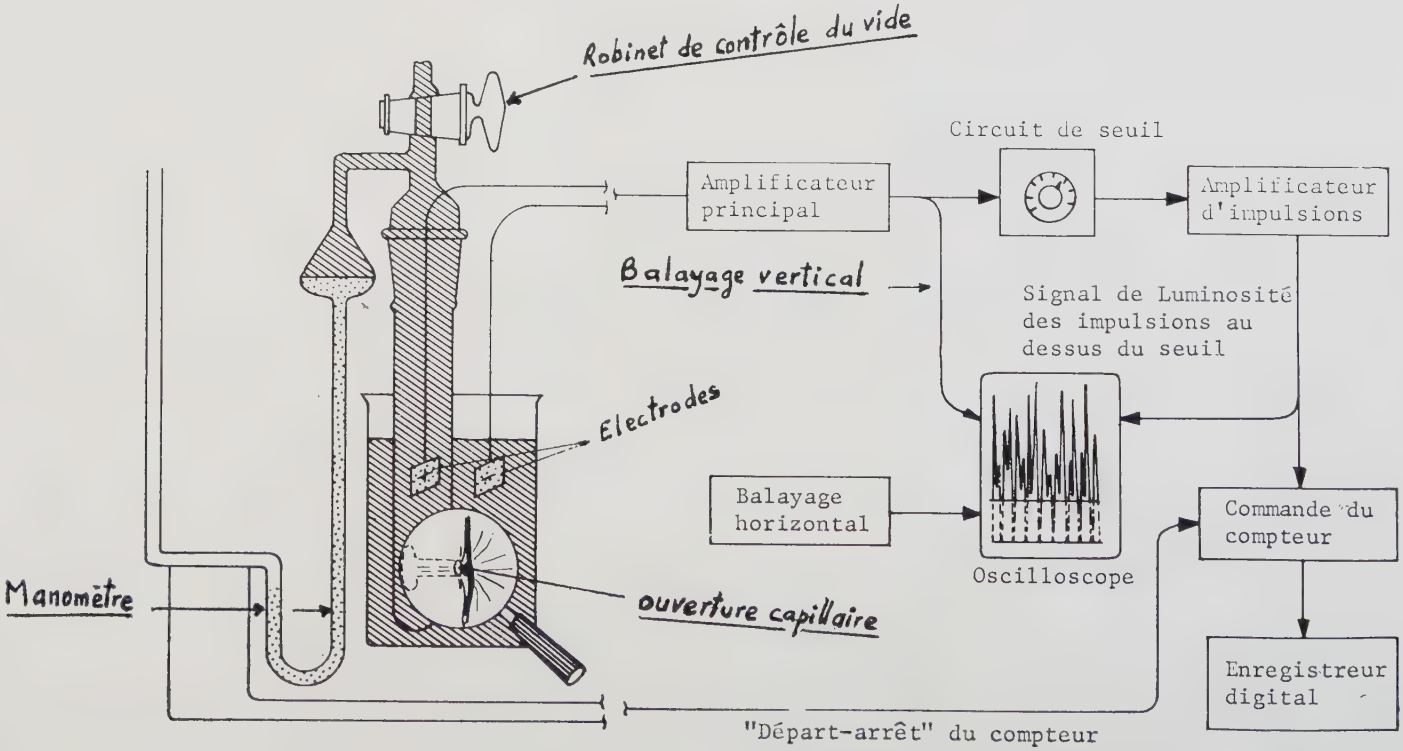


Fig. 1.

Schéma de principe du Compteur COULTER

II. - MATERIEL

1° - LE COMPTEUR ELECTRONIQUE ET SES ACCESSOIRES

Nous avons utilisé pour les analyses un compteur Coulter modèle A. Ce compteur comprend deux parties : la verrerie et le bloc-diagramme électronique reliés par des connexions électriques.

A) La verrerie

Elle se place à droite du bloc électronique et elle porte les éléments de détection des particules : ouverture capillaire avec ses électrodes, manomètre à mercure (*cf.* fig. 1).

L'ouverture capillaire est un orifice percé dans une plaque de saphir incorporée à un tube en verre qui plongera dans la suspension que l'on veut analyser.

Le manomètre assure, grâce aux mouvements de la colonne de mercure, le déclenchement et l'arrêt des mesures.

Outre ces principaux éléments, la verrerie porte également :

— un agitateur électrique dont la fonction est d'empêcher les phénomènes de sédimentation des particules ;

— une loupe destinée à la surveillance de l'orifice capillaire, mais en fait peu utilisée, car l'oscilloscope et

le manomètre signalent toute anomalie au niveau de l'orifice ;

— une cage de Faraday autour de l'ouverture capillaire ; le fond de cette cage, aménagé en support, reçoit le récipient contenant la suspension.

B) Le bloc-diagramme électronique

Tous les circuits électroniques sont assemblés dans ce bloc et la seule manipulation consiste, au moment du comptage, à appuyer sur le bouton de l'enregistreur. Nous donnons cependant une description sommaire de ces circuits pour faciliter l'interprétation du schéma de principe de l'appareil (*cf.* fig. 1).

Les impulsions issues des électrodes sont de faible amplitude ; elles sont appliquées à l'entrée d'un amplificateur principal linéaire ; la sortie de cet amplificateur est appliquée simultanément à deux circuits :

— le balayage vertical d'un tube cathodique ;

— le circuit de seuil, réglable manuellement.

Le seuil a pour particularité de pouvoir supprimer par le bas un certain pourcentage de spectre ; il joue donc le rôle de sélecteur des particules à compter.

A la suite du circuit de seuil, un nouvel amplificateur reçoit les signaux sélectionnés, les amplifie, assure la régulation de leur forme pour les rendre compatibles avec les circuits de comptage, et les renvoie simultanément sur :

1) le renforcement de luminosité de l'oscilloscope cathodique, dans le but de visualiser, sur le spectre, la ligne de seuil et de permettre à l'opérateur de voir le niveau de la sélection qu'il a réalisée ;

2) un circuit de relais électronique, commandé par les contacts du manomètre, qui déclenche l'enregistrement.

C) Accessoires

L'appareillage est complété par une pompe électrique dont la dépression est maintenue constante par un régulateur de vide. Entre cette source de vide primaire et le circuit de détection des particules formé par l'ouverture capillaire et le manomètre est intercalé un flacon de récupération des échantillons analysés et des eaux de lavage de la verrerie.

Pour limiter les influences externes et les interférences électriques sur la verrerie, il a fallu la placer dans une cage métallique et relier cette cage ainsi que le bloc électronique à la terre.

2° - MATERIEL CLASSIQUE DE BACTERIOLOGIE

En dehors du compteur électronique, nous avons eu besoin pour nos expériences du matériel suivant :

— flacons de 150 ml stériles, fermés par un bouchon à vis ;

— pipettes stériles ;

— boîtes de Pétri stériles ;

— source de chaleur (bec Bunsen) ;

— thermomètres de contrôle ;

— étuve à thermostat ;

— bain-marie à thermostat ;

— appareils et équipements pour la préparation des milieux de culture et la stérilisation du matériel (autoclave, four, appareil de distillation d'eau..., etc.).

III. - TECHNIQUE OPERATOIRE

1° - PREPARATION DES ECHANTILLONS

A) Milieux utilisés

— Gélatine spéciale :

Pour assurer la croissance des microcolonies en vue du comptage, nous utilisons une gélatine spéciale dont la composition (en grammes par litre d'eau) est la suivante :

gélatine Merck	150 g
peptone de caséine	10 g
extrait de levure	5 g
D. glucose	2 g

La gélatine, après sa préparation, est répartie dans des flacons et stérilisée à 121° C pendant 15 minutes. Après autoclavage, elle est conservée au froid.

— Eau physiologique :

Solution aqueuse de chlorure de sodium à 9 ‰.

— Mélange fixateur :

La fixation des microcolonies, après incubation de l'échantillon, s'obtient avec un mélange formol-acide chlorhydrique contenant :

solution de formaldéhyde à 35 %	80 parties
solution normale d'acide chlorhydrique . .	20 parties

— Electrolyte :

Fluide conducteur servant à la préparation des suspensions de microcolonies. C'est une solution aqueuse de chlorure de sodium à 9 ‰, additionnée de 1 ‰ de formol à 40 % pour en assurer la conservation.

— Gélose au lait :

Pour la méthode classique de numération bactérienne, en boîtes de Pétri.

Composition :

peptone pancréatique de viande	5 g
gélose	15 g
eau distillée q.s.p.	1 000 ml
lait écrémé frais	5 ml
glucose	1 g

La gélose au lait est répartie dans des flacons et stérilisée pendant 40 minutes à 115° C.

Tous les milieux destinés au comptage sont préparés avec de l'eau distillée filtrée pour en éliminer les particules étrangères.

B) Exécution des essais

Pour chaque échantillon de lait, nous effectuons deux prises d'essai, l'une destinée au comptage électronique, l'autre à la méthode classique de numération des colonies bactériennes sur gélose en boîtes de Pétri. Toutes les opérations se déroulent dans l'atmosphère d'un bec Bunsen, en prenant les précautions habituelles d'asepsie et d'antisepsie utilisées en bactériologie.

— Essai destiné au comptage électronique :

Nous préparons une dilution de lait à 1/500, en mélangeant soigneusement dans un flacon de 150 ml stérile et fermant hermétiquement :

0,12 ml de lait

6 ml d'eau physiologique

54 ml de gélatine spéciale (préalablement fondue et ramenée à une température de 30° C environ).

Après mélange de l'inoculum et du milieu, le flacon est plongé dans de l'eau froide jusqu'à solidification de la gélatine.

Après solidification, nous coulons dans le flacon une deuxième couche de 6 ml de gélatine spéciale pour éviter le développement de colonies en nappe à la surface. Le flacon est ensuite placé, pendant 20 heures, dans un bain-marie à thermostat contenant de l'eau maintenue à 21° C (± 1° C).

— Essai destiné à la méthode classique de numération :

Nous réalisons des dilutions successives décimales jusqu'à 10^{-6} du même lait dans des tubes à essais contenant 9 ml de solution de Ringer stérile diluée au quart. Nous portons 1 ml de chaque dilution dans une boîte de Pétri stérile et nous le mélangeons avec 15 ml environ de gélose au lait préalablement fondue et ramenée à 40° C. Après solidification du milieu, nous recouvrons la préparation avec une deuxième couche de gélose d'environ 5 ml pour empêcher la croissance en surface des germes qui pourraient former un voile (Proteus Bacillus). Les boîtes de Pétri sont placées à l'étuve à 32° C pendant 72 heures. Les colonies développées dans la profondeur de la gélose, au bout de ce délai, sont comptées à la loupe.

Il arrive fréquemment, lorsque le lait est assez pollué, que les boîtes contenant les premières dilutions soient inutilisables en raison du trop grand nombre de colonies ; nous écartons ces boîtes pour ne compter les colonies que sur les boîtes où elles se sont développées en nombre restreint.

Si n_x est le nombre de colonies sur la première boîte utilisable, n_{x+1} celui sur la boîte suivante, et ainsi de suite jusqu'à la boîte correspondant à la dilution 10^{-6} (n_6), le nombre de germes par millilitre de l'échantillon de lait s'obtient par la formule :

$$B = \left\{ \frac{n_x + n_{x+1} + \ldots + n_6}{1 + 0{,}1 + \ldots + 1/10^{6-x}} \right\} \times 10^x \text{ germes/ml}$$

Dans le cas où la première boîte pour laquelle les germes peuvent être dénombrés correspond à la dilution 10^{-3}, nous obtenons :

$$B = \left\{ \frac{n_3 + n_4 + n_5 + n_6}{1 + 0{,}1 + 0{,}01 + 0{,}001} \right\} \times 10^3 \text{ germes/ml}$$

Les boîtes où il n'y a pas de colonies bactériennes n'interviennent pas dans le calcul de B.

2° - LE COMPTAGE ELECTRONIQUE

Cette phase se déroule après l'incubation et elle comporte deux étapes :

— la préparation de la suspension ;

— le comptage proprement dit.

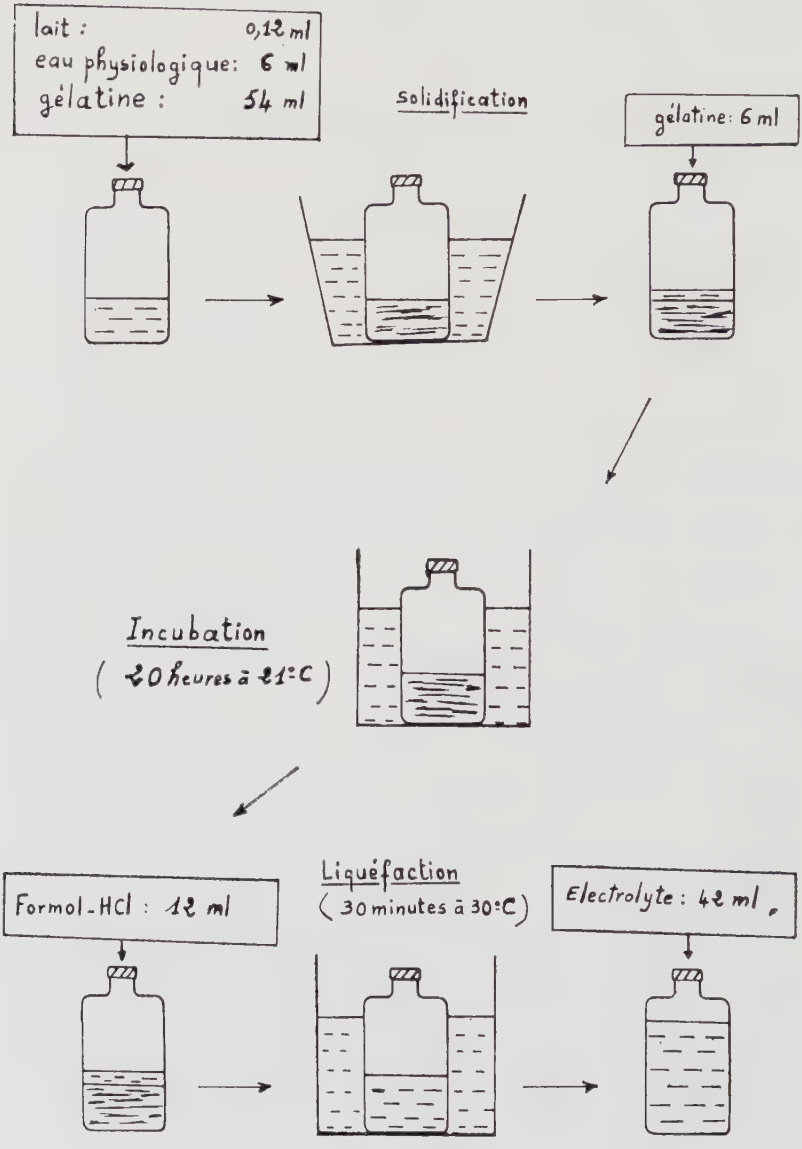
A) Préparation de la suspension

Introduire dans le flacon contenant la gélatine ensemencée et inoculée, 12 ml de fixateur, et placer l'ensemble au bain-marie à 30° C pendant 30 minutes pour liquéfier la gélatine.

Durant ces 30 minutes, nous préparons le compteur en vue de son utilisation : l'appareil est branché sur le secteur et nous en vérifions le fonctionnement. Le tube portant l'orifice capillaire est nettoyé et rempli avec de l'électrolyte.

Lorsque la gélatine est liquéfiée, nous introduisons 42 ml d'électrolyte dans le flacon que nous soumettons à un mouvement de rotation pour bien homogénéiser la suspension. Le contenu du flacon est transvasé dans un bécher propre que nous plaçons sur le support prévu à cet effet ; le support est remonté de façon que l'agitateur, l'électrode extérieure et le tube portant l'orifice capillaire plongent dans la suspension. L'agitateur est mis en marche et réglé de manière à ne pas provoquer la formation de mousse.

Fig 2 Schéma récapitulatif des opérations subies par la prise d'essai destinée au comptage électronique.



Volume global : 120,12 ml ≃ 120 ml

Dilution finale : $\frac{0,12}{120} = \frac{1}{1000}$

B) Comptage des microcolonies

La suspension étant en place, nous choisissons une intensité de courant d'ouverture définie et le seuil correspondant. Un aide placé face à la verrerie ouvre le robinet de contrôle du vide ; il y a aspiration de la suspension ; nous déclenchons l'enregistreur tandis que l'aide ferme le robinet ; le comptage s'effectue et le résultat apparaît en chiffres lumineux sur le cadran du compteur. Pour chaque combinaison d'intensité de courant et de seuil, nous opérons deux ou trois comptages pour nous assurer de la reproductibilité des résultats et, à défaut de celle-ci, pour faire la moyenne de plusieurs comptages successifs. En effet, d'un comptage à l'autre, il y a inversion de la polarité des électrodes du micro-orifice et les deux polarités ne donnent pas toujours des résultats concordants.

Pendant le comptage, il est nécessaire de surveiller l'image de l'oscilloscope et les mouvements de la colonne de mercure pour déceler toute anomalie dans le comptage.

Entre les examens de deux échantillons de lait, la verrerie est nettoyée avec de l'électrolyte pour éviter que la gélatine, en se solidifiant par refroidissement, ne bouche tout le dispositif de verrerie dans lequel elle a pénétré. Ce nettoyage évite également des erreurs de comptage dues à une contamination d'un échantillon par des restes de l'échantillon précédent sur le tube et l'agitateur.

A la fin du comptage, la verrerie est rincée abondamment par aspiration d'eau chaude à travers un circuit annexe de nettoyage ; le flacon de récupération est vidé et lavé ; l'appareil est débranché et recouvert d'une housse de protection.

PARAMETRES DU COMPTEUR COULTER

Pour comprendre les résultats relevés sur le compteur et en faire usage, il est nécessaire de connaître certains

paramètres que nous allons décrire brièvement avant d'entreprendre l'analyse des résultats.

— LE GAIN

Il comporte 6 *positions dont chacune fait varier le gain électrique de l'amplificateur de* $\sqrt{2}$ *par plot, c'est-à-dire que, lorsqu'on passe de la position* 1 *à la position* 2 *du gain par exemple, on augmente l'amplification de* $\sqrt{2}$ *sur l'une et l'autre polarité des électrodes. Pour les cas courants, il est recommandé de le laisser sur la position moyenne* 3 *; nous avons maintenu le gain à cette position pour tous les comptages.*

— LE SEUIL (t') ET L'INTENSITÉ DU COURANT D'OUVERTURE (I)

Le gain étant fixe, ces deux paramètres correspondent aux réglages manuels de l'appareil ; t' représente les valeurs de seuil et I la position du sélecteur de courant d'ouverture. Ces valeurs servent à établir une échelle cohérente de volumes (calcul de t). Le seuil (t') comporte 101 *positions possibles et I,* 11 *positions.*

— RÉSISTANCE D'OUVERTURE ET FACTEUR F

La résistance de l'ouverture capillaire doit être connue puisque le sélecteur de courant (I) ne fait que rajouter une résistance connue en série avec l'ouverture. On la mesure facilement avec un voltmètre en relevant la chute de tension aux bornes de l'ouverture pendant que l'électrolyte y circule. Pour l'appareil que nous utilisons, dans les conditions de l'expérience, cette résistance mesurée est de 30 000 *ohms.*

Le facteur F, facteur d'expansion de cadran de seuil,

défini par la résistance d'ouverture, s'obtient à l'aide d'une table livrée avec l'appareil. Pour une résistance d'ouverture (R) mesurée, la table donne F pour toutes les positions de I.

— FACTEUR t

t' et I définissent des valeurs choisies arbitrairement par l'opérateur qui sélectionne des volumes de plus en plus grands ou de plus en plus petits. Le facteur F « redresse » la non-linéarité provoquée par la résistance d'ouverture. t est le produit de t' et de F.

$$t = t' \times F$$

t exprime une échelle cohérente de volumes relatifs. Nous retrouvons ici la notion déjà énoncée dans le principe, à savoir que la hauteur d'impulsion et la réponse instrumentale sont essentiellement proportionnelles au volume des particules et à la résistivité de l'électrolyte.

Le cadran de seuil, qui joue le rôle de sélecteur des particules, est gradué arbitrairement de 0 à 100 ; on le prend comme échelle de base des dimensions des particules et, selon la position du sélecteur de courant, on applique différents facteurs à cette échelle : ces facteurs sont les facteurs F, en concordance avec la résistance d'ouverture.

— FACTEURS d ET K

d (diamètre de la sphère équivalente à la particule) peut être tiré de t : le diamètre est égal à la racine cubique du volume relatif multipliée par une constante K, appelée facteur d'étalonnage, car c'est le facteur nécessaire pour convertir les lectures de l'appareil (qui

sont des volumes arbitraires de particules) en diamètres de particules sphériques équivalentes :

$$d = K \sqrt[3]{t}$$

On détermine K grâce au processus d'étalonnage ; l'étalonnage de l'appareil se fait à l'aide d'une suspension compris entre 5 et 20 % du diamètre d'ouverture utilisé. Nous avons réalisé l'étalonnage avec une suspension de grains de pollen de bouleau argenté de 22 µ de diamètre ; le seuil est réglé de façon à obtenir un comptage à mi-hauteur ; pour ce comptage, l'image de l'oscilloscope étant un faisceau assez régulier, nous avons pris le seuil pour lequel la moitié inférieure du faisceau est effacée. d'un produit monodimensionnel dont le diamètre est Nous avons obtenu les valeurs suivantes :

$$I = 4$$

$$t' = 24$$

$$F = 0{,}1275 \text{ (}\textit{donnée par la table pour } I = 4 \textit{ et } R = 30\,000 \textit{ ohms}\text{)}$$

$$\textit{d'où } t = t' \times F = 24 \times 0{,}1275 = 3{,}05$$

Calcul de K :

$$d = K \sqrt[3]{t} \rightarrow K = \frac{d}{\sqrt[3]{t}} = \frac{22}{\sqrt[3]{3{,}05}} = 15{,}2$$

Le facteur K diffère pour chaque combinaison de dimension d'ouverture, de résistivité d'électrolyte et de réglage de gain ; comme nous conservons tous ces éléments constants pour nos expériences, le facteur K calculé reste le même : K = 15,2.

— COINCIDENCE : facteur P et n"

La correction pour coïncidence, qui a pour but de tenir compte des erreurs de comptage lorsque, sur une suspension riche, plusieurs particules traversent simultanément l'ouverture capillaire, se lit sur une table livrée avec l'appareil. Si n' est le chiffre relevé sur le compteur, n" est la somme de n' et de la correction pour coïncidence (P).

$$n'' = n' + P$$

La correction n'intervient que pour $n' \geqslant 2\,000$ *(ouverture de* 200 µ*). Le chiffre corrigé n est égal à n" moins les parasites éventuels :*

$$n = n'' - \text{parasites} = n' + P - \text{parasites}$$

La dilution finale de l'échantillon de lait est de 1/1 000 ; *le comptage s'effectue sur un volume de suspension de* 0,5 *ml.*

$$N \text{ (nombre de germes par ml de lait)} = 2 \times n \times 1\,000$$

$$N = 2\,000\ n \text{ germes/ml}$$

Dans l'exposé des résultats, nous ne mentionnerons que les valeurs de N.

BILAN

Les divers paramètres que nous venons d'étudier vont nous permettre de connaître le diamètre des microcolonies que nous comptons et de dresser la grille suivante :

TABLEAU N° 1

K = 15,2

Classes	Gain	I	t'	F	$t = t' \times F$	$d = K \sqrt[3]{t}$
a	3	1	100	1	100	70,5 µ
b	3	2	100	0,501	50,1	59
c	3	3	100	0,252	25,2	44,5
d	3	4	100	0,1275	12,75	35,5
e	3	5	100	0,0652	6,52	28,5
f	3	5	50	0,0652	3,26	22,5
g	3	5	25	0,0652	1,63	17,8
h	3	6	25	0,0340	0,85	14,4
i	3	7	25	0,0185	0,46	11,7

Ce tableau montre que les particules comptées ne sont pas les mêmes lorsque t' et I varient. Pour le même gain de 3, quand, par exemple, t' = 50 et I = 5, nous enregistrons les particules de diamètre supérieur ou égal à 22,5 µ et quand t' = 100 et I = 2, nous éliminons du comptage toutes les particules dont le diamètre est inférieur à 59 µ.

Ne connaissant pas « a priori » la dimension des microcolonies du lait, nous avons défini cette grille de 9 classes (de a à i) pour pouvoir étudier la répartition des microcolonies en fonction de leur taille. D'autres combinaisons de t' et de I sont possibles et la gamme de dimensions que l'appareil peut déceler est très étendue.

Nous avons retenu cette grille parce qu'elle est d'utilisation aisée et qu'elle s'est révélée suffisante au cours des analyses que nous avons effectuées. Au-dessus de $d = 70{,}5$ µ (*classe a*), *il y a relativement peu de colonies, et au-dessous de* $d = 11{,}7$ µ (*classe i*) *les erreurs dues au passage en coïncidence et au comptage de particules fines apportées par l'inoculum (globules gras de diamètre voisin de* 15 µ) *ou présentes dans le milieu de culture sont trop importantes.*

RESULTATS DU COMPTAGE

I. — RESULTATS

II. — DISCUSSION

III. — CRITIQUE DE LA METHODE

I. — RESULTATS

Les analyses ont été effectuées sur du lait cru conditionné en sachet plastique et sur dú lait pasteurisé conditionné en berlingot, vendus dans des grands magasins de Toulouse. Un même échantillon de lait a été utilisé quelquefois pous plusieurs examens, après séjour de quelques heures sur la paillasse du laboratoire pour modifier son état bactériologique.

Pour chaque échantillon de lait, nous donnons le nombre de germes par millilitre (N) en fonction de la classe de comptage (*cf.* tableau 1) et le résultat fourni par la numération des colonies sur gélose en boîtes de Pétri (B).

TABLEAU N° 2

Echantillon n°	N en fonction de la classe de comptage									B
	a	b	c	d	e	f	g	h	i	
1	0	0	16 000	26 000	36 000	72 000	308 000	614 000	2 766 000	34 500
2	6 000	12 000	20 000	46 000	76 000	132 000	166 000	564 000	3 406 000	48 200
3	26 000	50 000	120 000	194 000	300 000	490 000	680 000	1 140 000	2 980 000	45 000
4	0	0	4 000	18 000	40 000	40 000	108 000	650 000	2 316 000	—
5	0	0	8 000	28 000	50 000	92 000	120 000	760 000	1 600 000	172 700
6	30 000	70 000	210 000	554 000	1 040 000	1 080 000	1 500 000	1 910 000	3 580 000	420 000
7	0	0	0	0	12 000	40 000	100 000	400 000	3 540 000	90 900
8	24 000	56 000	72 000	86 000	86 000	120 000	210 000	480 000	3 260 000	—
9	0	0	0	0	22 000	50 000	134 000	360 000	2 290 000	90 000
10	80 000	114 000	134 000	150 000	180 000	280 000	396 000	684 000	1 920 000	2 700 000
11	428 000	790 000	1 140 000	1 142 000	1 230 000	1 324 000	3 260 000	5 520 000	—	—
12	0	0	26 000	54 000	80 000	168 000	320 000	570 000	1 590 000	—
13	0	0	0	22 000	26 000	70 000	198 000	396 000	1 680 000	72 000
14	0	10 000	14 000	40 000	50 000	104 000	224 000	530 000	1 980 000	87 000
15	0	10 000	26 000	52 000	72 000	108 000	130 000	628 000	3 520 000	189 000
16	370 000	828 000	1 660 000	2 114 000	2 140 000	2 632 000	3 248 000	4 230 000	9 244 000	600 000
17	—	1 502 000	2 730 000	4 010 000	10 080 000	—	—	—	—	12 600 000
18	50 000	120 000	190 000	270 000	340 000	580 000	866 000	1 526 000	4 080 000	1 340 000
19	18 000	40 000	54 000	88 000	100 000	180 000	336 000	752 000	2 310 000	202 000
20	0	18 000	22 000	36 000	76 000	100 000	184 000	464 000	1 358 000	140 000
21	54 000	236 000	616 000	1 124 000	1 610 000	2 010 000	2 526 000	3 080 000	3 108 000	127 000
22	430 000	1 004 000	1 900 000	2 784 000	2 862 000	4 816 000	5 384 000	6 288 000	8 802 000	1 370 000
23	8 000	14 000	50 000	130 000	302 000	470 000	684 000	962 000	1 746 000	85 200
24	36 000	130 000	288 000	414 000	570 000	790 000	1 148 000	1 624 000	3 094 000	497 000
25	82 000	170 000	324 000	394 000	490 000	720 000	1 026 000	1 916 000	10 280 000	282 700
26	76 000	160 000	300 000	514 000	872 000	2 052 000	3 060 000	4 540 000	11 140 000	3 000 000
27	0	0	0	16 000	34 000	62 000	192 000	636 000	3 140 000	91 800
28	72 000	164 000	280 000	500 000	740 000	1 060 000	1 392 000	2 688 000	6 940 000	1 200 000
29	0	0	8 000	28 000	50 000	92 000	120 000	760 000	1 650 000	182 700
30	300 000	780 000	1 600 000	2 150 000	3 624 000	7 460 000	10 020 000	—	—	5 900 000
31	876 000	1 980 000	3 504 000	3 800 000	8 114 000	9 920 000	—	—	—	2 450 000
32	0	10 000	24 000	38 000	54 000	128 000	236 000	616 000	1 834 000	14 800
33	0	0	0	0	20 000	40 000	120 000	760 000	2 380 000	27 000
34	0	0	0	12 000	28 000	68 000	200 000	280 000	542 000	11 000
35	0	0	0	6 000	10 000	54 000	172 000	640 000	2 210 000	70 000
36	0	0	0	6 000	24 000	86 000	230 000	580 000	2 096 000	170 000
37	0	0	0	0	34 000	54 000	360 000	480 000	2 200 000	50 800
38	0	0	6 000	10 000	36 000	70 000	260 000	626 000	2 240 000	72 700
39	60 000	124 000	130 000	160 000	170 000	234 000	400 000	740 000	1 890 000	110 000
40	0	0	0	10 000	30 000	62 000	180 000	488 000	1 560 000	—
41	66 000	168 000	196 000	220 000	250 000	440 000	640 000	1 300 000	4 200 000	23 600
42	74 000	156 000	188 000	234 000	270 000	500 000	848 000	1 780 000	9 800 000	154 500
43	0	0	0	12 000	42 000	76 000	176 000	498 000	1 340 000	11 000
44	0	0	8 000	18 000	26 000	80 000	240 000	570 000	1 820 000	244 500
45	0	0	0	16 000	20 000	68 000	180 000	440 000	1 650 000	237 000
46	0	14 000	36 000	58 000	110 000	220 000	580 000	1 820 000	7 080 000	195 000
47	0	0	0	24 000	74 000	220 000	620 000	1 760 000	5 236 000	240 000
48	0	0	8 000	34 000	98 000	188 000	650 000	1 378 000	2 264 000	—
49	0	0	0	0	30 000	58 000	154 000	426 000	1 588 000	44 500
50	0	0	0	24 000	68 000	82 000	906 000	998 000	2 038 000	28 300
51	0	0	16 000	40 000	72 000	102 000	190 000	408 000	1 410 000	71 000
52	0	0	0	14 000	16 000	62 000	220 000	514 000	1 780 000	20 000
53	0	0	0	6 000	30 000	56 000	154 000	476 000	1 550 000	22 700
54	0	16 000	44 000	90 000	190 000	460 000	1 344 000	4 400 000	—	15 000
55	0	0	10 000	28 000	36 000	82 000	320 000	900 000	3 004 000	12 000

II. — DISCUSSION

— Dans la gélatine spéciale utilisée comme milieu de culture, les germes du lait se développent pour donner des colonies de taille très variable. Les colonies sont visibles, en partie, à l'œil nu, sous forme de petits points blanchâtres qui troublent plus ou moins le milieu selon leur nombre. La taille des colonies est d'autant plus réduite que la suspension est plus riche, ce qui s'explique, du moins partiellement, par la gêne réciproque que les germes exercent les uns sur les autres pendant l'incubation lorsqu'ils sont en grand nombre.

— Pour un échantillon de lait, le nombre de micro-colonies augmente quand le diamètre minimum « sélecté » diminue.

— La grande dispersion des colonies selon la taille constitue un obstacle majeur à l'interprétation des résultats. Notre objectif était de voir si la répartition des colonies se faisait de manière que l'on puisse retenir une combinaison de paramètres applicable à tous les échantillons et permettant de les comparer objectivement. Sur une centaine d'échantillons analysés, la réponse est négative ; les différences peuvent se situer à n'importe quel niveau. Nous pouvons tout au plus, et en admettant que presque toutes les colonies sont comptées à ce niveau, hasarder des comparaisons à la dernière classe (classe i).

— Comptage limité aux colonies dont le volume est supérieur ou égal à 6 000 μ^3.

Les chercheurs allemands, dont les travaux ont servi de base à notre étude, préconisent le comptage exclusif des colonies ayant un volume minimum de 6 000 μ^3 ; ces colonies correspondent approximativement

à la classe (f) sur notre grille. Il suffirait dans ces conditions de déterminer les valeurs de t' et de I pour lesquelles toutes les colonies de diamètre inférieur à 22,5 µ ne sont pas comptées. Cette pratique limiterait les manipulations en cours de comptage, et elle offre l'avantage de réduire les erreurs dues au passage en coïncidence, le nombre de colonies étant relativement peu élevé.

Mais ce choix, totalement arbitraire, ne satisfait pas l'esprit, car l'expérience montre que pour un même échantillon, surtout s'il est très pollué, les comptages de la classe (f) sont notablement différents de ceux obtenus à la classe (i). Ces écarts ne résultent pas, comme on pourrait le penser, de la présence de microparticules étrangères, de diamètre inférieur à celui des microcolonies bactériennes. En effet, des comptages à « blanc » effectués sur les milieux de culture et de dilution, sans adjonction de lait, pris dans les mêmes proportions et soumis aux mêmes traitements qu'un prélèvement normal, donnent en classe (i) des valeurs négligeables par rapport à celles enregistrées à ce niveau sur les échantillons de lait. Les écarts numériques s'expliquent par le fait que, dans un échantillon très pollué, les colonies bactériennes sont de taille plus réduite.

Il serait hasardeux, voire dangereux, de conclure qu'un échantillon qui renferme peu de colonies à 6 000 μ^3, est plus salubre qu'un autre qui en contient plus pour ce volume mais trois fois moins que le précédent à 4 000 μ^3 (classe g).

Ces chercheurs reconnaissent, du reste, les insuffisances d'un tel système et ne proposent pas de normes pour juger de la qualité du lait.

— Rapports entre les résultats fournis par la méthode classique de numération et ceux obtenus par le comptage électronique.

Quel que soit le volume retenu pour le comptage électronique, il ne semble pas qu'il y ait de relation entre les deux méthodes. Cela se comprend facilement ;

en effet, les milieux de culture diffèrent sensiblement, de même que les températures et les délais d'incubation. Les germes qui se développent dans la gélose au lait au bout de 3 jours à 32° C ne sont pas forcément les mêmes que ceux qui poussent dans la gélatine en 20 heures à 21° C. Un lait peu pollué au comptage électronique peut apparaître très riche en germes sur la gélose en boîte de Pétri, et inversement.

Le comptage électronique permet simplement de déterminer les valeurs relatives du nombre de germes capables de se développer dans des conditions de milieu, de température et d'espace données. Comme toutes les méthodes d'examen de laboratoire, ce procédé présente des défauts dont on ne peut toujours mesurer la portée ; les avantages qu'il offre doivent être analysés et comparés aux inconvénients.

III. — CRITIQUE DE LA METHODE

1° - LES AVANTAGES

— La gélatine est un milieu de culture très commode à manipuler : elle est liquéfiée à 30° C, température peu brutale, facilement supportée par les colonies microbiennes, et elle reste liquide à 24-25° C, rendant possible le comptage à la température ambiante.

— La préparation des échantillons peut être entièrement automatisée pour supprimer toute fatigue et les erreurs individuelles souvent propres aux méthodes classiques de numération.

— Le comptage proprement dit est une opération facile et rapide ne nécessitant pas de compétence particulière. Deux personnes n'ayant aucune notion d'électronique ni de bactériologie peuvent exploiter correctement et en continu un compteur Coulter après 24 à 48 heures d'initiation, et après que l'appareil aura été réglé par un spécialiste.

— Le procédé offre la possibilité aux utilisateurs éventuels de s'associer pour acheter un seul compteur, comme c'est le cas, actuellement, pour le compteur Coulter modèle Hématologie. Basé sur le même principe, mais beaucoup plus perfectionné que le modèle A, le modèle Hématologie livre en quelques secondes, imprimés sur une feuille de résultats, le nombre de globules rouges, le nombre de globules blancs, la formule leucocytaire, le pourcentage d'hémoglobine, etc.

L'Hôpital Régional de Purpan (Toulouse) dispose d'un seul compteur pour les examens d'hématologie qui y sont effectués et huit médecins de Toulouse se

sont associés pour l'achat d'un compteur qu'ils utilisent en continu avec l'aide d'un seul employé.

— A cette économie de matériel et de personnel s'ajouterait un gain de temps appréciable en raison de la courte durée d'incubation nécessaire au développement des germes.

2° - LES INCONVÉNIENTS

a) *Inconvénients liés à l'appareil et à son utilisation*

— Le principal défaut du compteur Coulter modèle A utilisé en bactériologie réside dans son extrême sensibilité aux variations de courant du secteur, malgré l'interposition d'un régulateur, et à des interférences d'origine indéterminée se traduisant par des impulsions parasites d'élimination difficile. Nous avons entouré la verrerie d'une cage de Faraday supplémentaire, sans réussir à supprimer totalement ces parasites qui apparaissent de façon irrégulière et rendent le compteur inutilisable certains jours.

— La reproductibilité des résultats n'est pas parfaite et les différences entre les deux polarités sont parfois trop accusées.

— Le compteur n'est relativement précis que dans certaines limites de richesse en germes. Pour de faibles concentrations de colonies ($n' < 50$), les résultats varient souvent du simple au triple entre deux comptages successifs et, pour les fortes concentrations ($n' > 5\,000$), l'appareil est pratiquement inutilisable, car les corrections en coïncidence n'existent plus pour de telles valeurs. Or, on ne peut pas connaître « a priori » le degré de pollution des laits que l'ont veut examiner et choisir ceux qu'il faut confier au comptage électronique et ceux qu'il faut en écarter.

b) *Inconvénients liés à la méthode : valeur de la méthode*

— Certaines espèces bactériennes ne se développent pas dans les conditions de l'expérience et elles n'entreront pas dans le comptage, bien qu'elles existent. La même critique toutefois vaut pour le dénombrement sur gélose en boîte de Pétri.

— Le comptage automatique ne donne pas le nombre absolu de germes par millilitre de lait. La faible dilution utilisée a pour conséquence que de nombreux germes en chaînette ou en amas, non dissociés pendant l'ensemencement, donnent une seule colonie et sont comptés comme une unité.

— La dispersion de la suspension avec séparation nette des microcolonies n'est jamais parfaite ; on mesure quelquefois des amas de microcolonies au lieu des microcolonies isolées (passage en coïncidence).

— Il est difficile de connaître l'exactitude des résultats enregistrés ; le comptage direct à l'aide d'une loupe ou d'un microscope est une opération fastidieuse, et il est irréalisable sur un échantillon très pollué dans lequel les colonies sont très petites.

— Mais l'inconvénient majeur de la méthode réside dans la difficulté d'expression des résultats. La présentation des résultats sous une forme utilisable et significative fait intimement partie de toute analyse. Il existe plus de cent façons de présenter les résultats d'un comptage de particules ; la mise au point d'une feuille de résultats adaptée à la bactériologie avec des normes permettant des comparaisons sérieuses entre différents échantillons, nous semble la condition « sine qua non » d'une généralisation éventuelle du comptage électronique des microcolonies pour apprécier la qualité bactériologique du lait.

CONCLUSION

En dépit des critiques apportées à la méthode du comptage électronique, il nous est difficile d'écarter une méthode qui réduit la fatigue, le temps et le prix des analyses. Les méthodes classiques de numération bactérienne restent incapables de satisfaire les demandes croissantes de l'industrie concernant de grandes quantités d'analyses à réaliser rapidement. Le comptage automatique des particules, largement utilisé dans d'autres branches de l'industrie, peut apporter des solutions nouvelles à la bactériologie des denrées alimentaires. Il faut espérer que des améliorations techniques du matériel jointes à la définition de normes pour les différentes catégories de lait, rendront possible l'emploi, sur une grande échelle, du comptage électronique des microcolonies comme méthode d'appréciation de la qualité bactériologique du lait.

Sans partager, pour l'instant, l'opinion des auteurs allemands qui proposent cette méthode pour les examens de routine du lait cru au niveau de la Communauté Economique Européenne, nous pensons, cependant, qu'à une époque où l'automatisme et la rapidité d'exécution ont autant d'importance que la précision, le comptage électronique des microcolonies mérite l'attention des Hygiénistes et nous espérons, par ce modeste travail, ouvrir un débat duquel sortiront d'utiles conclusions.

Vu : Le Professeur de l'Ecole Vétérinaire
rapporteur

Ch. LABIE

Vu : Le Président de la Thèse

Mme ENJALBERT

Vu : Le Directeur de l'Ecole
Vétérinaire

R. FLORIO

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Toulouse, le 29-4-1971
: Le Président de l'Université
Paul Sabatier

UNIVERSITÉ PAUL SABATIER - TOULOUSE

L. LARENG

BIBLIOGRAPHIE

1. Commission des communautés européennes. — Direction générale de l'Agriculture, sous-groupe « Lait et Produits Laitiers ». *Document.* 23 038/VI/69-F - Bruxelles, 25 mai 1970.

2. Coultronics-France. — 14, rue Eugène-Legendre, 95-Margency. *Documentation technique des Compteurs Coulter.*

3. Deysson (G.) et M^lle^ Thi Lau (N.). — *Annales pharmaceutiques Françaises.* T. 21, n° 4, 1963, p. 275 à 285.

4. Guichard (J.-C.) et de Bernard (A.). — *Chimie analytique,* n° 3, mars 1965, pp. 145-151.

5. Painvin (P.-M.), M^me^ Panouse-Perrin (J.) et German (A.). — C.R. *Acad. Sc. Paris,* T. 266, série D, 18 mars 1968, pp. 1337-1338.

6. Petransxienne (D.) et Lapied (L.). — *La qualité bactériologique du lait : Analyses et tests.* 1 vol., 138 p., Paris, 1962, R. Goujon édit.

7. Pontigny (J.A.). — « *Mesures* », vol. 31, n° 11, novembre 1966, pp. 88-94.

8. Segal (Sh.) et Laurence (K.A.). — *Annales Acad. Sc. New York,* vol. 99, art. 2, juin 1962, pp. 262-270.

9. Tolle (A.), Zeidler (H.) et Heeschen (W.). — *Milchwissenschaft,* n° 21, 1966, pp. 93-97.

10. Tolle (A.), Zeidler (H.) et Heeschen (W.). — *Milchwissenschaft,* n° 23, 1968, pp. 65-70.

11. Ullrich (O.A.). — Analyse de la dimension des particules fines et résultats obtenus avec un analyseur électrique. - Rapport présenté à « *Instrument Society of American Conference* », New York, 26 septembre 1960.

12. Vuillaume (R.) et Thieulin (G.). — Eléments pratiques d'analyse et d'inspection du lait : 3e édit., 1 vol., 388 p., Paris, 1965, édité par la revue le « *Lait* ».

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 11

PROTOCOLE EXPERIMENTAL 12

RESULTATS DU COMPTAGE 37

CONCLUSION 49

BIBLIOGRAPHIE 51

S. E. I. L.
14, RUE ERNEST-RENAN
TOULOUSE